Tome 63, nº 32. — Décembre 1956

Die Bedeutung der Epidermisleiste für die Entwicklung der Beine von *Xenopus laevis* Daud. [1])

von

P. A. TSCHUMI

(Dept. of Anatomy, University, Cambridge)

Mit 2 Textfiguren

I. EINLEITUNG

In einer früheren Mitteilung (Tschumi, 1955) wurde über Vitalmarkierungsversuche berichtet, welche zeigten, dass das Wachstum der Hinterbeinknospen von *Xenopus* ausgesprochen appositionell ist, indem im „apikalen Proliferationsbereich" des Knospenmesenchyms das Material der präsumtiven Beinabschnitte in proximo-distaler Reihenfolge niedergelegt wird. Diese Versuche ergaben, dass die Extremitätenentwicklung bei *Xenopus* dem Wachstum der Flügelknospe des Hühnchens vergleichbar ist (siehe Saunders, 1948).

Die Befunde Saunders' (1948) über die Unentbehrlichkeit der apikalen Epidermisleiste für das Wachstum der Flügelknospen weckten für das in den dreissiger Jahren schon intensiv bearbeitete Problem der Wechselbeziehungen zwischen Epidermis und Mesenchym der Beinknospen (siehe Steiner, 1928; Filatow, 1930; Rotmann, 1933; Balinsky, 1935) wiederum lebhaftes Interesse. Einerseits gaben sie zu weiteren Untersuchungen beim Hühnchen Anlass (siehe Saunders, 1951; Cairns und Saunders, 1954;

[1] Die Durchführung dieser Arbeit wurde durch Stipendien der „Nuffield Foundation" und des „Schweizerischen Nationalfonds" ermöglicht.

Zwilling, 1955), und andererseits regten sie zu erneuter Analyse der Wechselbeziehungen zwischen Ektoderm und Mesoderm der Extremitätenanlagen bei Amphibien an.

Nachdem sich bei *Xenopus* durch Transplantation von larvaler Kopfhaut auf die Knospenspitze das apikale Wachstum hemmen liess (Tschumi, 1955), musste auch bei Amphibien eine ähnliche Bedeutung der Epidermis vermutet werden wie beim Hühnchen. Weitere Experimente, die an anderer Stelle ausführlich publiziert werden, haben diese Annahme bestätigt.

II. DIE ABHÄNGIGKEIT DES BEINKNOSPENWACHSTUMS VON DER EPIDERMIS

Zur Prüfung der Abhängigkeit des apikalen Wachstums des Knospenmesenchyms von der Epidermis wurden folgende Versuche angestellt: Die Epidermis von Hinterbeinknospen verschiedener Grösse (0,3 mm - 2,7 mm Länge) wurde abgezogen, und das so entblösste Mesenchym wurde in die Bauchwand derselben oder einer gleichalterigen Larve transplantiert, entweder zwischen Bauchepidermis und -muskulatur oder zwischen Bauchmuskulatur und Peritoneum. Im letzten Fall sollte sich das Mesenchym ohne jeglichen Kontakt mit Epidermis entwickeln, im ersten Fall kam das Transplantat unter ortsfremde und schon differenzierte Epidermis zu liegen. Als Kontrollen wurden Beinknospen mit intakter Epidermis in die Bauchwand der Larven transplantiert. Die Transplantate entwickelten sich wie folgt:

Die mit Epidermis transplantierten Beinknospen entwickelten sich ausnahmslos zu vollständigen Extremitäten. Dies zeigt, dass die Beinentwicklung auch in diesem fremdartigen Milieu normal weiter geht, dass namentlich die Proliferation des distalen Mesenchyms durch den Transplantationsort nicht beeinträchtigt wird.

Aus den Mesenchymtransplantaten, dagegen, entstanden nie ganze Beine. Wohl entwickelten sich daraus typische Extremitätenteile, aber stets fehlten distale Abschnitte in verschiedenem Ausmasse, je nach dem Alter der Spenderknospe: Aus dem Mesenchym von Knospen, deren Länge 0,45 mm nicht überschritt, differenzierten sich nur Teile des Beckengürtels. Betrug die Knospenlänge 0,45-0,55 mm, dann entwickelte sich zusätzlich das proximale

Ende des Femur oder ein ganzer Oberschenkelknochen. Aus dem Mesenchym grösserer Knospen entstanden nebst den proximalen Elementen auch distalere Abschnitte, bis 0,9 mm Knospenlänge Unterschenkelteile, von 0,9-1,5 mm Tarsalia und Metatarsalia, und von 1,5 mm aufwärts Phalangen in zunehmender Anzahl. Aus isoliertem Beinknospenmesenchym entwickeln sich somit in erster Linie proximale Extremitätenteile. Je älter und grösser die Spenderknospe ist, desto mehr distale Segmente werden ausgebildet.

Ein Vergleich dieser Entwicklungsleistungen von isoliertem Beinknospenmesenchym mit der prospektiven Bedeutung des transplantierten Mesenchyms zeigt, dass sich aus isoliertem Knospenmesoderm höchstens nur diejenigen Beinelemente entwickeln, die zur Zeit der Transplantation bereits niedergelegt waren. Die im Markierungsversuch noch nicht nachweisbaren distalen Beinabschnitte kommen nicht zur Entwicklung.

Aus diesen Befunden lässt sich folgern, dass das Mesenchym der Knospenspitze ohne Epidermis nicht mehr proliferieren kann, und dass daher nach Entfernung der Knospenepidermis keine distalen Beinabschnitte mehr niedergelegt werden. Die Tatsache, dass die Mesenchymtransplantate langsam an Grösse zunehmen und sich völlig ausdifferenzieren, zeigt, dass das Wachstum und die Differenzierung des einmal niedergelegten prospektiven Beinmaterials nicht weiter den Einflüssen der Epidermis unterliegt.

III. DIE BEDEUTUNG DER EPIDERMIS FÜR DIE ENTWICKLUNG DES BLUTKREISLAUFSYSTEMS DER BEINKNOSPE

Der Einfluss der Epidermis auf das apikale Knospenwachstum kann nicht darin erblickt werden, dass sie an das unterliegende Mesenchym Zellen abgibt, wie dies Rose (1948) für die Beinregeneration vermutet hat. Die auch distal wohl ausgebildete und ununterbrochene Basalmembran würde einen massiven Übertritt von Zellen kaum gestatten. Zudem konnte ich nach Markierung der Epidermis nie ein Einwandern markierter Zellen beobachten. Das neue Mesenchym entsteht mit grösserer Wahrscheinlichkeit durch mitotische Zellteilung im distalen Mesenchym selbst.

Als Quelle der hierzu benötigten Aufbaustoffe kommt in erster Linie das Blutkreislaufsystem in Betracht, und in der Tat wird die intensiv proliferierende Knospenspitze stark durchblutet: Junge, rundliche Beinknospen werden durch ein Netz von Blutkapillaren versorgt, welche bis zur Spitze der Knospe reichen. Wenn die Knospe wächst und sich verlängert, entwickelt sich aus dem distalen Kapillarennetz ein grösseres Blutgefäss, welches die Spitze der Knospe umfliesst: die Marginalvene. Bei ca. 1 mm langen Knospen erhält dieses Gefäss ihr Blut aus einem System radial angeordneter Kapillaren, die einer zentral gelegenen Beinarterie entspringen. Die Marginalvene fliesst in post-axialer Richtung um die Knospenspitze, versenkt sich dann etwas ins Innere der Knospe und mündet an deren Basis in eine grössere Vene ein. Nach der Herausbildung der Zehenplatte fliesst die Marginalvene dicht unterhalb der distalen Epidermis dem Palettenrand entlang. Die aus der Tarsalregion stammenden radialen Kapillaren gruppieren sich zu 3-4 Bündeln, die zwischen den sich differenzierenden Strahlenanlagen liegen.

Die Herausbildung des auffallend grossen Marginalgefässes sowie der zuführenden Kapillaren steht zweifellos mit der intensiven Proliferation des apikalen Mesenchyms im Zusammenhang. Die Marginalvene umspült gleichsam die proliferierende Knospenspitze, und später die Spitze der einzelnen Zehenanlagen, und sichert ihnen damit eine optimale Zufuhr von Aufbaustoffen.

Ein Vergleich der Blutgefässe von normalen und von ohne Epidermis sich entwickelnden Beinknospen ergab nun, dass die Entwicklung des Marginalgefässes der Beinknospe sowie der mit ihm verbundenen Kapillaren an die Anwesenheit der Beinknospenepidermis gebunden ist: Die Mesenchymtransplantate bilden an ihrem distalen Ende nie eine Marginalvene; im Zusammenhang damit fehlt auch das charakteristische Blutkapillarensystem der Knospenspitze, welche dadurch nur noch schwach durchblutet wird.

Nach diesen Befunden könnte die entwicklungsphysiologische Bedeutung der Epidermis für die apikale Proliferation des Mesenchyms darin erblickt werden, dass sie die Ausbildung des Blutgefässmusters in der Knospenspitze kontrolliert, dem proliferierenden Blastem damit die erforderliche reichliche Durchblutung sichert und auf diesem Wege die Bildung der präsumtiven Bein-

abschnitte in proximo-distaler Reihenfolge überhaupt ermöglicht. Der Unterbruch der apikalen Proliferation nach Entfernung der Epidermis könnte somit die Folge einer unzureichenden Blutversorgung des wachsenden Blastems sein.

IV. VERSUCHE ÜBER DIE BEDEUTUNG DER EPIDERMISLEISTE BEI *XENOPUS*

Die Behauptung, den Gliedmassenanlagen der Amphibien fehle eine Epidermisleiste, ist unrichtig (siehe SAUNDERS, 1948; ZWILLING, 1956). Die Leiste kann bei *Xenopus* sowohl am lebenden Objekt wie auf histologischen Schnitten nachgewiesen werden bei Knospen, die nur wenig länger sind als breit. Sie ist schwächer ausgebildet als bei den Amnioten und ist kaum mehr als 1-2 Zellschichten hoch.

Es geht nun besonders aus Schnitten deutlich hervor, dass das Marginalgefäss der Beinknospe der Epidermisleiste entlang verläuft und von ihr durch nur 1-2 Schichten von Mesenchymzellen getrennt wird. Dies warf die Frage auf, ob nicht die Epidermisleiste selbst mit der Entwicklung des Marginalgefässes in Beziehung steht. Es wurden daher folgende Versuche an Beinknospen von *Xenopus*-larven ausgeführt:

Beinknospen, bei denen die Ausbildung der flachen Zehenplatte noch nicht erfolgt war, wurde die ganze Epidermis unter möglichster Schonung derselben so abgezogen, dass sie nachher wie eine Kappe und in beliebiger Orientierung wieder aufgesetzt werden konnte. Zur Erleichterung der Orientierung wurde die Epidermisleiste zuerst mit Nilblau leicht angefärbt. Bei 30 Knospen wurde die abgezogene Epidermis um ca. 90 Grad gedreht und derart wieder über das Mesenchym gestülpt, dass der ventrale (prae-axiale) Bereich der Leiste nun seitlich zu liegen kam (Abb. 1).

In 16 Fällen, in denen die Epidermiskappe gross genug und unverletzt war und glatt anheilte, war nach 1-3 Tagen die Querstellung der erhalten gebliebenen Leiste klar ersichtlich. Nach 4-6 Tagen hatte sich unter dem Transplantat eine neue Marginalvene entwickelt. Diese floss aber nicht mehr, wie ursprünglich, in ventro-dorsaler (post-axialer) Richtung der Knospenspitze entlang, sondern, der neu orientierten Epidermisleiste folgend, in mediolateraler Richtung. Die Zehenplatte, die sich aus diesen Beinen

entwickelte, war ebenfalls um 90 Grad gedreht, entsprechend der Orientierung der Epidermisleiste und des Marginalgefässes. Sämtliche Beine zeigten in der Folge eine Tendenz, diese Drehung zu

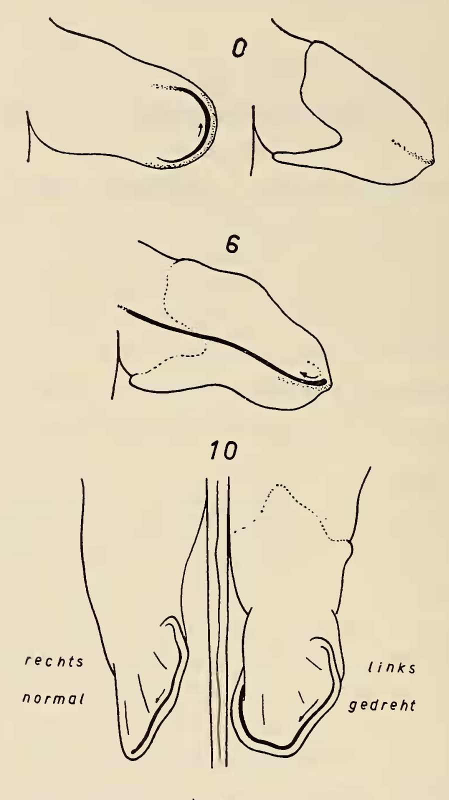


Abb. 1.

Oben: Die Epidermis der Beinknospe wird abgezogen und nach Drehung um 90 Grad wieder aufgesetzt. Beachte Epidermisleiste (punktiert). — *Mitte:* Dieselbe Knospe nach 6 Tagen. Eine neue Marginalvene fliesst der quergestellten Randleiste entlang. — *Unten:* Linkes und rechtes Bein derselben Larve nach 10 Tagen. Das linke Bein mit gedrehter Epidermis entwickelt sich um fast 90 Grad gedreht weiter.

kompensieren, aber trotzdem entwickelten sich einige Extremitäten mit abgedrehtem Fuss (Abb. 2).

In drei Fällen bedeckte die rotierte Epidermis den prae-axialen Rand der Knospenspitze, an welchem sich die Epidermisleiste ursprünglich befand, unvollständig. Dort regenerierte eine neue

Epidermisleiste. Diese Beine besassen somit 2 Randleisten, die ursprüngliche, nun gedrehte, und die am alten Ort regenerierte Leiste. Beide Leisten induzierten die Bildung einer Marginalvene



Abb. 2.
Larve vor der Metamorphose, mit abgedrehtem Fuss, der sich nach Drehung der Epidermis entwickelte.

sowie einer Zehenplatte, und es entwickelten sich Beine mit teilweise verdoppeltem Fuss. Auf die Beziehungen zwischen Fussverdoppelung und Epidermisleiste beim Hühnchen hat kürzlich Zwilling (1956*b*) hingewiesen.

Es geht aus diesen Versuchen hervor, dass die apikale Epidermis der Beinknospe, und sehr wahrscheinlich die Epidermisleiste selbst, für die Entwicklung und Orientierung der Marginalvene verant-

wortlich ist. Sie bestimmt zudem auch die Orientierung der Zehenplatte und des Fusses.

Die Möglichkeit, dass der Epidermis anhaftende und mitgedrehte Mesenchymzellen einen Einfluss auf das Ergebnis dieser Versuche hatten, darf nicht ausser Acht gelassen werden. Die Menge mittransplantierten Mesenchyms war aber stets minimal, denn in den meisten Fällen wurde die ursprüngliche Marginalvene der Knospe, die dicht unter der Epidermis verläuft, beim Abziehen der Epidermis nicht beschädigt, sodass das Blut in ihr eine Zeit lang noch weiter floss.

Nach Abschluss dieser Arbeit erschien eine Publikation von Zwilling (1956 *a*), in der über analoge Drehungsversuche mit der distalen Epidermis der Hühnchengliedmassen berichtet wird. Auch hier bestimmt die um 90° gedrehte Epidermis die Polarität der sich entwickelnden distalen Extremitätenabschnitte. Die Einflüsse, die die Epidermis auf das proliferierende Mesoderm der Extremitätenanlage ausübt, sind somit bei Vögeln und Amphibien viel ähnlicher als weitläufig angenommen wird. Der Mechanismus, der diesen Einflüssen zugrunde liegt, bedarf noch weiterer Analyse. Der Umstand, dass in der Epidermisleiste der Säuger alkalische Phosphatase (McAlpine, 1955) sowie Ribonukleinsäure (Hinrichsen, 1956) angehäuft sind, zeigt eine besondere Stoffwechselaktivität der Epidermisleiste an und mag, wie dies Hinrichsen für möglich hält, vielleicht sogar mit der Synthese induzierender Stoffe im Zusammenhang stehen. Die mechanischen Einflüsse, die die gesamte Knospenepidermis und namentlich ihre Leiste auf das unterliegende Blastem ausüben, dürften aber ebenfalls von grosser Bedeutung sein.

Wie in einer jetzt im Druck befindlichen Arbeit dargelegt wird, erwirbt das Ektoderm seine Gliedmassen-spezifischen Eigenschaften vom Extremitätenmesoderm. Die Faktoren für Extremitätenbildung überhaupt, für die Spezifität, Polarität und Wachstumsrate der Beine würden also ursprünglich im mesodermalen Anlagenmaterial liegen. Von besonderem Interesse ist nun der Befund, dass, nachdem das Mesoderm in der Epidermis die Bildung der genannten Eigenschaften und Strukturen induziert hat, diese auf das proliferierende Blastem zurückwirken und für das Wachstum und das Determinationsgeschehen unentbehrlich sind. Trotz seiner führenden Rolle in der Extremitätenentwicklung bedarf das

Mesoderm somit dieser fortwährenden Wechselbeziehungen mit der Epidermis, um seine Potenzen zu realisieren. Damit erweist sich die Extremitätenentwicklung als eine typische „kombinative Einheitsleistung" (Lehmann, 1933) der beiden, mesodermalen und ektodermalen, Komponenten.

Summary

1. The hind limb buds of *Xenopus* grow mainly by apical proliferation.
2. The apical proliferation is absent in limb bud mesenchyme which develops in isolation from epidermis.
3. The apical marginal blood vessel of the limb bud does not develop when the epidermis of the bud is missing.
4. There is an apical ectodermal ridge also in the limb buds of *Xenopus*.
5. Rotation of the distal epidermis of the limb bud by 90 degrees is followed by the development of a new marginal vessel along and closely under the rotated ectodermal ridge and by the formation of a similarly rotated digital plate. The ectodermal ridge thus controls the course of the marginal vessel and the polarity of the proliferating mesenchymal structures of the limb.

LITERATUR

Balinsky, B. I. 1935. *Selbstdifferenzierung des Extremitätenmesoderms im Interplantat.* Zool. Jahrb. Allg. Zool. Physiol. 54: 327-348.

Cairns, J. M. and J. W. Saunders. 1954. *The influence of embryonic mesoderm on the regional specification of epidermal derivatives in the chick.* J. exp. Zool. 127: 221-248.

Filatow, D. 1930. *Über die Wechselbeziehungen des Epithels und des Mesenchyms einer vorderen Extremitätenknospe beim Axolotl.* Arch. Entwmech. Org. 121: 288-311.

Hinrichsen, K. 1956. *Die Bedeutung der epithelialen Randleiste für die Extremitätenentwicklung.* Z. Anat. Entw-Gesch. 119: 350-364.

LEHMANN, F. E. 1933. *Das Prinzip der kombinativen Einheitsleistung in der Biologie, im besonderen in der experimentellen Entwicklungsgeschichte, und seine Beziehung zur Gestalttheorie.* Biol. Zbl. 53: 471-496.

McALPINE, R. J. 1955. *Alcaline glycerophosphatase in the early development of the limb buds of the rat embryo.* Anat. Rec. 121: 408.

ROSE, S. M. 1948. *Epidermal dedifferentiation during blastema formation in regenerating limbs of Triturus viridescens.* J. exp. Zool. 108: 337-361.

ROTMANN, E. 1933. *Die Rolle des Ektoderms und Mesoderms bei der Formbildung der Extremitäten von Triton. II. Operation im Gastrula- und Schwanzknospenstadium.* Arch. Entwmech. Org. 129: 85-119.

SAUNDERS, J. W. 1948. *The proximo-distal sequence of origin of the chick wing and the role of the ectoderm.* J. exp. Zool. 108: 363-404.

— 1951. *The role of the mesoderm in organizing the regional specificity of epidermal derivatives in the skin of the chick.* Anat. Rec. 111:450.

STEINER, K. 1928. *Entwicklungsmechanische Untersuchungen über die Bedeutung des ektodermalen Epithels der Extremitätenknospe von Amphibienlarven.* Arch. Entwmech. Org. 113: 1-11.

TSCHUMI, P. A. 1955. *Versuche über die Wachstumsweise von Hinterbeinknospen von Xenopus leavis Daud. und die Bedeutung der Epidermis.* Rev. Suisse Zool. 62: 281-288.

ZWILLING, E. 1955. *Ectoderm-mesoderm relationship in the development of the chick embryo limb bud.* J. exp. Zool. 128: 423-441.

— 1956*a*. *Interaction between limb bud ectoderm and mesoderm in the chick embryo. I. Axis establishment.* J. exp. Zool. 132: 157-171.

— 1956*b*. *Interaction between limb bud ectoderm and mesoderm in the chick embryo. II. Experimental limb duplication.* J. exp. Zool. 132: 173-187.